

学校编码: 10384
学号: 21620071152056

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗肿瘤候选新药去乙酰真菌环氧乙酯的
液体发酵及其制备的研究

Study on the Liquid Fermentation and Preparation of
Anti-tumor Drug candidate Deacetylmycoepoxydiene

周显凤

指导教师姓名: 黄 耀 坚 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 5 月 10 日

论文答辩时间: 2010 年 6 月 05 日

学位授予日期: 2010 年 月 日

答辩委员会主席: 郑忠辉 教授

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
前 言.....	1
一、海洋天然产物概况.....	1
二、红树真菌及其次级代谢产物.....	3
1 红树植物及红树真菌简介.....	3
2 红树真菌抗肿瘤活性物质.....	4
3 红树内生真菌 A-1-2-3 及其代谢产物.....	9
三、微生物液体发酵.....	10
1 液体发酵技术概述.....	10
2 微生物液体发酵的优化方法.....	12
2.1 摇瓶培养法.....	12
2.2 分批及补料分批发酵.....	12
2.3 发酵条件的控制.....	15
四、天然产物的纯化与制备.....	16
五、本论文研究的目的、内容及意义.....	18
材料与amp;方法.....	20
一、实验材料.....	20
二、实验方法.....	23
1 技术路线.....	23
2 液体发酵及粗提物的提取.....	23
2.1 摇瓶培养.....	23
2.2 DAM 的液体深层发酵.....	24
2.3 发酵参数控制.....	24
2.4 200 L 罐的 DAM 发酵中试.....	25
2.5 发酵液纳滤浓缩.....	26
2.6 发酵参数的测定.....	27
3 DAM 的定性定量分析.....	28
3.1 薄层层析 (TLC).....	28
3.2 高效液相色谱 (HPLC).....	28
3.3 紫外光谱分析.....	29
4 中压反相柱层析 (RP-18).....	29
4.1 吸附动力学实验.....	29
4.2 中压反相柱层析实验过程.....	29
4.3 DAM 的穿透曲线.....	30
5 DAM 的结晶.....	30
5.1 静态溶析结晶.....	30
5.2 反溶剂的用量.....	31

5.3 反溶剂的导入方式.....	31
5.4 动态溶析结晶.....	31
6 纯度分析.....	32
6.1 HPLC 法检测纯度	32
6.2 质谱检测.....	32
6.3 <i>X-Ray</i> 单晶衍射.....	32
6.4 气相色谱法分析溶剂残留.....	32
6.5 ICP-MS 重金属检测	32
结果与分析.....	34
一、菌株 G1-1 摇瓶培养	34
1 G1-1 摇瓶发酵影响因素的研究	34
1.1 溶解氧的影响.....	34
1.2 剪切力的影响.....	35
二、DAM 的深层发酵条件优化及放大	36
1 10 L 罐中 DAM 发酵产量的主要影响因素	36
1.1 HPLC 法检测 DAM 产量	36
1.2 G1-1 生长临界氧浓度和 KLa 的测定	37
1.3 发酵基质的调整.....	39
1.4 发酵液残糖含量控制.....	41
1.5 添加前体对 DAM 发酵产量的影响	43
2 200 L 罐的 DAM 发酵中试.....	44
三、DAM 的纯化及制备	46
1 发酵液预处理及提取.....	46
2 DAM 的吸附动力学	47
2.1 吸附剂的选择	47
2.2 静态吸附动力学.....	47
2.3 静态吸附等温线.....	47
3 反相柱层析分离 DAM	50
3.1 DAM 的穿透曲线	50
3.2 反相柱层析制备过程优化.....	51
4 结晶与重结晶纯化 DAM	54
4.1 结晶体系的确定.....	54
4.2 反溶剂的用量.....	56
4.3 反溶剂的导入方式.....	56
4.4 动态溶析结晶的影响因素.....	57
4.5 结晶残液的回收.....	60
4.6 重结晶与晶体干燥.....	61
5 DAM 制备与纯化的扩大试验	62
5.1 DAM 的小量制备总得率和纯度	62
5.2 DAM 的规模制备	62
四、DAM 的分析及纯度检测	63
1 紫外光谱分析.....	63
2 TLC 和 HPLC 检测纯度.....	64

3 质谱检测.....	65
4 <i>X-Ray</i> 晶体衍射.....	65
5 气相色谱 (GC) 检测溶剂残留	66
6 重金属检测.....	66
讨论与结论	67
一、溶解氧和剪切力对 DAM 发酵的影响	67
二、DAM 发酵条件的优化及放大	67
三、DAM 发酵过程的流加补料	68
四、DAM 发酵液粗提物的制备	69
五、DAM 的纯化与制备	70
六、DAM 杂质分析	71
七、进展与展望.....	72
参考文献.....	74
附 录	84
致 谢.....	88

Catalogue

Abstract.....	I
Abstract in English.....	III
Introduction	1
I The summary of marine natural products	1
II Mangrove fungi and their secondary metabolites.....	3
1 Mangrove plants and the fungi	3
2 The antitumor bioactive substances by mangrove fungi.....	4
3 Endophytic fungus A-1-2-3 and its metabolites	9
III Microbial liquid fermentation.....	10
1 The summary of liquid fermentation	10
2 Optimization of fermentation conditions	12
2.1 Shake flask culture.....	12
2.2 Batch and fed-batch fermentation.....	12
2.3 Control of fermentation conditions.....	15
IV Purification and preparation of microbial natural products.....	16
V Purpose, Content and significance of this thesis	18
Materials and methods	20
I Materials	20
II Methods.....	23
1 Technology Roadmap	23
2 Fermentation and extraction of fermentation broth	23
2.1 shake flask culture.....	23
2.2 Submerged fermentation.....	24
2.3 Fermentation parameter control.....	24
2.4 Pilot fermentation of DAM in 200 L fermentor.....	25
2.5 Nanofiltration of fermentation broth.....	26
2.6 Determination of fermentation parameters	27
3 Qualitative and quantitative analysis of DAM.....	28
3.1 Thin layer chromatography(TLC).....	28
3.2 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)	28
3.3 UV spectrum assay	29
4 Medium pressure RP Liquid Chromatography(RP-18)	29
4.1 Adsorption kinetics experiments.....	29
4.2 Experiment process of RP-18	29
4.3 Breakthrough curve of DAM	30
5 Crystallization of DAM	30
5.1 Static solvent-out crystallization.....	30
5.2 content of anti-solvent.....	31

5.3 Introduction method of anti-solvent.....	31
5.4 Dynamic solvent-out crystallization	31
6 Purity Analysis	32
6.1 Purity detection by HPLC	32
6.2 Mass Spectrometry.....	32
6.3 X-Ray single crystal diffraction.....	32
6.4 Residual Solvents detection by Gas Chromatography.....	32
6.5 Heavy metal detection by ICP-MS	32
Results and Analysis	34
I Shake flask culture of G1-1.....	34
1 Study of fermentation parameters of G1-1 in shake flask	34
1.1 The effect of dissolved oxygen	34
1.2 The effect of Shear force.....	35
II Optimization and amplification of submerged fermentation	36
1 Factors of DAM yield in 10 L fermentor	36
1.1 Critical oxygen concentration and K_La detection	36
1.2 Detection of DAM yield by HPLC assay	37
1.3 The regulation of culture medium.....	39
1.4 Residual sugar control in fermentation	41
1.5 The effect of adding precursors on fermentation	43
2 The pilot fermentation of DAM in 200 L fermentor.....	44
III Purification and preparation of DAM	46
1 Pretreatment and extraction of fermentation broth	46
2 Adsorption kinetics experiments of DAM	46
2.1 The choice of adsorbent	47
2.2 Static adsorption kinetic.....	47
2.3 Static adsorption isotherm.....	47
3 Separate DAM with RP-18	50
3.1 Breakthrough curve of deacetylmycoepoxydiene.....	50
3.2 Optimization of preparation process in RP-18.....	51
4 Purification with crystallization and recrystallization	54
4.1 Optimization of the crystallizing system	54
4.2 Anti-solvent content	56
4.3 Introduction methods of anti-solvent	56
4.4 The effect factors of dynamic solvent-out crystallization.....	57
4.5 Recover the crystallization residue	60
4.6 Recrystallization and crystal drying.....	61
5 Amplification experiment of DAM preparation	62
5.1 DAM recovery and purity in small-scale preparation.....	62
5.2 Large-scale preparation of DAM	62
IV Purity assay of DAM.....	63
1 UV spectrum assay	63
2 Purity assay with TLC and HPLC	64

3 Mass spectrometry	65
4 <i>X-Ray</i> single crystal diffraction.....	65
5 Residual solvent detection by gas chromatography.....	66
6 Heavy metal detection.....	66
Discussion and Conclusion.....	67
I The effects of DO and shear force on DAM fermentation	67
II Optimization and scale-up in submerged fermentation of DAM	67
III Feding in the process of DAM fermentation	68
IV Preparation of crude extract of DAM fermentation broth	69
V Purification and preparation of DAM	70
VI Impurity analysis of DAM	71
VII Progress and Prospects.....	72
References	74
Appendix.....	84
Acknowledgement	88

摘 要

近年来,随着药物研究热点的转移,新药的开发已经拓展到了生态和物种较陆地生境更为复杂多样的海洋。海洋微生物特殊的生境,决定了其具有独特的代谢途径和防御机制。红树植物生长于海岸潮间带,其独特的生长环境赋予它丰富的微生物资源,已经成为近些年来备受瞩目的药用新资源。

本论文研究了海洋抗肿瘤候选新药去乙酰真菌环氧乙酯(Deacetylmycoepoxydiene, DAM)的液体发酵及提取制备工艺。DAM 是红树植物内生真菌 A-1-2-3(*Phomopsis* sp. A-1-2-3)产生的一种骨架新颖的环氧二烯类化合物,具有较好的细胞毒作用。经动物试验抗肿瘤活性测定,该化合物对乳腺癌、胃癌等实体瘤具有显著的抑制活性,且毒性较低。菌株 G1-1 是 DAM 高产突变株,在前期摇床培养基优化的基础上,本论文对菌株 G1-1 摇瓶培养条件进行了摸索,并进行了 10 L 发酵罐的放大和优化。发酵培养基为葡萄糖 65 g/L、马铃薯 200 g/L、20%海水(V/V),通过补料控制残糖含量在 10 g/L,溶解氧控制 20%以上,该菌株在 10 L 罐中发酵 15 d, DAM 产量最高达 97.6 mg/L,约为摇瓶培养的 2 倍。

补料是提高 DAM 发酵产量的重要手段,本文对添加前体乙酸钠、发酵后期残糖恒浓度控制流加等流加方式进行了比较。结果表明,发酵中后期(7-15 d)残糖浓度控制在约 10 g/L 的水平,能较大幅度提高 DAM 产量。在 10 L 罐发酵的基础上进行了 200 L 罐的中试放大,发酵培养基为葡萄糖 65 g/L、马铃薯 200 g/L、20%海水(V/V)。发酵 7-15 d 残糖含量控制在 10 g/L 以及溶解氧保持 20%以上的发酵条件下,发酵 15 d, DAM 发酵产量达到 125.9 mg/L。

微生物生物活性代谢产物的制备是工业微生物发酵生产的重要内容。本文以 DAM 产品的纯度和得率为指标,侧重研究了 DAM 中压反相柱层析和溶析结晶制备的工艺参数。中压反相柱层析过程中,进料量 46.5 mg/g 和流速为 20 mL/min 的条件下, DAM 发酵粗提物的制备纯度为从 10.1%提高到 75%,得率为 93.6%。溶析结晶正交实验的结果显示,在 $V(\text{丙酮}):V(\text{水})$ 为 2:3、结晶温度 15 °C、反溶剂流加 3 h 的组合下, DAM 的纯度从 75%提高到 89.8%,收率为 82.8%,通过方差分析,发现结晶温度和反溶剂含量对结晶影响较为明显。采用重结晶方法, DAM 的纯度可以提高到 99%以上。通过对 DAM 制备参数的优化,本文初步制

定了 DAM 制备工艺流程，即：发酵液→纳滤→乙酸乙酯萃取→真空浓缩→中压反相柱层析→溶析结晶→重结晶。进一步对制备规模进行放大试验，结果显示该工艺路线可靠，制定的相关工艺参数合理，主要生产指标稳定，DAM 的纯度达 99%以上，回收率高于 74%。

DAM 晶体呈白色针状，无味，易溶于丙酮，甲醇等有机溶剂。重结晶后晶体进行干燥，分别采用 HPLC、GC 和 ICP-MS 等技术对发酵制备的 DAM 纯品进行检测和分析，结果显示样品中无甲醇、丙酮等有机溶剂残留，As、Cu、Cd、Ag 等重金属也均未检测出。

关键词：红树真菌；去乙酰真菌环氧乙酯；液体发酵；柱层析；溶析结晶

Abstract

The hot spot for searching novel drugs has been focused on the much more complex marine resources in recent years. Because of their special living conditions, marine microorganisms often produce various bioactive substances with novel functions and structures.

Mangrove plants, as important new resources for potential pharmaceutical because of their ecosystems that straddled the land and the sea, have gradually attracted people's attention.

In this study, the fermentation parameters and preparation of a marine anti-tumor drug candidate deacetylmycoepoxydiene (DAM) was studied. DAM, a second metabolic product of endophytic fungi *Phomopsis* sp. A-1-2-3, which contains an oxygen-bridged cyclooctadiene, is novel and represents a new class of fungal metabolites. It had a good cytotoxic activity, anti-tumor activity in animal tests showed that the compound had significant inhibition activity to breast, stomach and other solid tumors. Strain G1-1 is an mutant of *Phomopsis* sp. A-1-2-3, the yield of DAM by solid-state fermentation of mutant G1-1 was over 100 mg/L, Based on previous optimization in shake flask culture, the liquid fermentation in 10 L fermentor was studied. When the residual sugar was controlled at 10 g/L by feeding and the dissolved oxygen over 20%, the yield of DAM in 10 L fermentor was optimized upto 97.6 mg/L, twice as in shake flask.

Fed-batch fermentation was an important way to improve the yield of DAM, in this study, adding precursor sodium acetate and constant concentration of residual sugar control were compared. When the concentration of residual sugar was controlled at 10 g/L from d7 to d15, the results showed that the yield of DAM was substantially enhanced. Based on the studies in 10 L fermentor, the fermentation was scaled upto 200 L, in 200 L fermentor, when the residual sugar was controlled at 10 g/L and the dissolved oxygen over 20% in the whole process, the yield of DAM reached 125.9 mg/L in d15.

Preparation of bioactive metabolites is an important part of the industrial

microbial fermentation. The study focused on researching the parameters of medium pressure reverse phase column chromatography(RPLC) and solvent-out crystallization, the experiment indexes were purity and recovery. In medium pressure RPLC, when the sample amount and flow rate were 46.5 mg/g and 20 mL/min respectively, the purity of DAM was increased from 10.1% to 75%, the recovery was 93.6%. The orthogonal result illustrated that the purity of DAM was increased from 75% to 89.8%, the recovery was 82.8%, through analysis of variance, the results showed that the temperature and anti-solvent content had a more obvious effect on crystallization, the purity of DAM reached to over 99% after recrystallization. After the studies, the preparation process was initially developed as follows: fermentation broth → nanofiltration → ethyl acetate extraction → vacuum concentration → medium pressure RPLC → crystallization → recrystallization. The preparation process was further enlarged, the result shew that the process route was reliable, the parameters were reasonable, the purity of DAM was over 99% and the total recovery over 74%.

The DAM crystal was dried after recrystallization, then the DAM was detected and analyzed by HPLC, GC and ICP-MS respectively, methanol, acetone and other organic solvents were not detected, neither were the heavy metals, including As、Cu、Cd、Ag, etc.

Key words: mangrove fungi; deacetylmycoepoxydiene; liquid fermentation; column chromatography; solvent-out crystallization.

前 言

近年来,随着癌症发病率的不断升高,天然药物抗肿瘤作用已日益成为研究的热点。据 WHO 国际肿瘤研究理事会报道,到 2020 年全球肿瘤发病率将上升 50 %到每年 1500 万,癌症已经严重威胁人类的健康。

从自然界中筛选更新的,更有效的抗癌药物已成为了该领域的研究重点。传统研究获得有用的代谢产物主要集中在陆地的植物和微生物上,然而近年来大量的开采已经造成资源枯竭、效率降低、成本增加等问题,人们开始把研究热点转移到了生态和物种远比陆地生境复杂多样的海洋。海洋约占地球总面积的 3/4,拥有特殊生境和丰富的自然资源,是潜在天然药物来源的重要领域。

一、海洋天然产物概况

天然产物和天然产物衍生物已经成为绝大部分新药的主要来源^[1],已备受关注。作为可培养海洋微生物的一个组成部分,对海洋真菌研究的不断升温尤其显著,其作为海洋环境中的重要组成部分,已经成为许多天然产物的来源之一^[2]。

海洋天然产物是研究与开发具有良好活性的创新药物先导化合物的重要来源,海洋环境丰富的化学和生物多样性使得它成为发现新型抗癌药物的重要资源^[3]。过去的十几年被视为从海洋生物中获得临床前抗癌先导化合物急剧增长的一段时间^[4],随着人们对海洋微生物的深入研究,从海洋中发现了许多结构新颖且具有抗肿瘤活性物质,使得海洋微生物成为抗癌药物新发现的研究热点。

在过去的 40 多年,海洋天然产物每年都以一定的速度增长,但发现新化合物的速率却有所下降。近年来,从海洋中发现新的天然产物的增长相对稳定,2007 年相对于 2006 年增长 24%左右。从 1965-2007 年海洋天然产物年平均年产量趋势如图 1-1 所示,在海洋生物不同门中的分布如图 1-2^[5,6]。

2009年, Hongbing Liu等^[7]从皮海绵真菌*Aspergillus ustus*中分离得到七个新的Drimane类倍半萜化合物(1-3, 6-9),化合物4, 5, 10为已知化合物,通过细胞毒活性试验,化合物6, 7, 10对肿瘤细胞L5178Y, HeLa和PC12等都显示了很好的细胞毒活性,其中化合物7活性最高,具体细胞毒活性见表1-1。

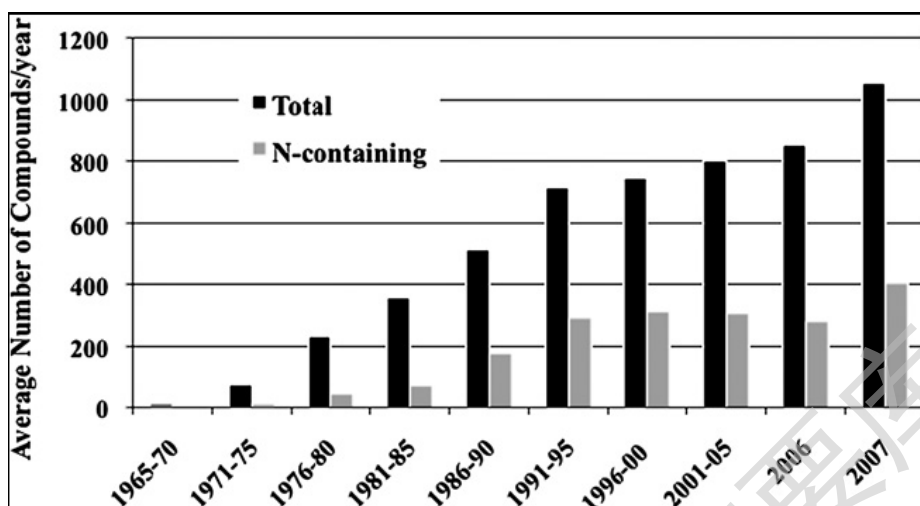


图 1-1 1965-2007 年海洋天然产物年平均年产量趋势^[5]

Fig.1-1 Annual output of marine natural products from 1965 to 2007

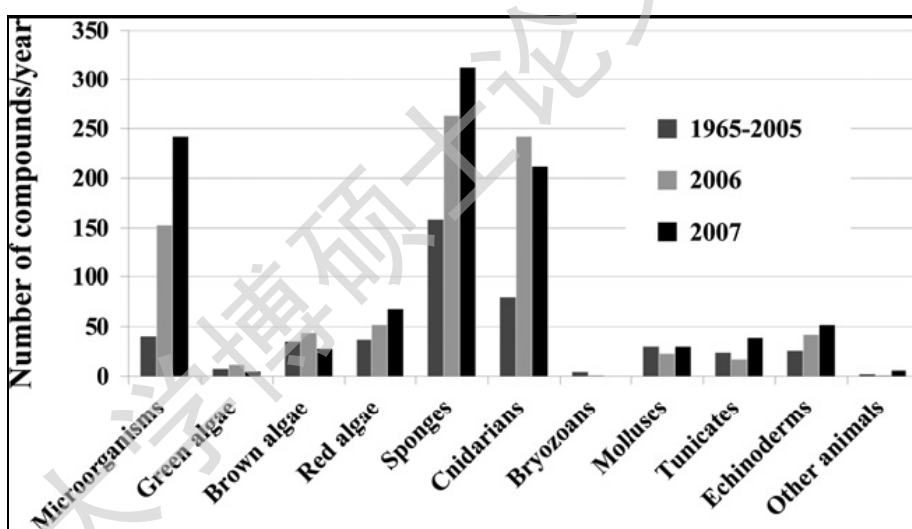


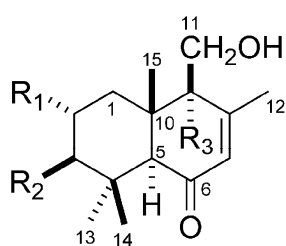
图 1-2 海洋天然产物按门分类的分布趋势^[5]

Fig.1-2 Distribution trend of marine natural products by phylum

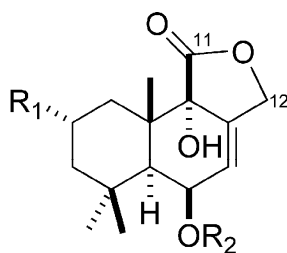
表1-1 化合物的细胞毒活性

Tab.1-1 Cytotoxicity assay for isolated compounds

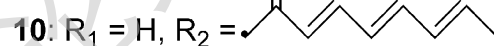
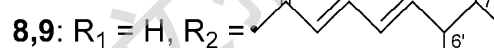
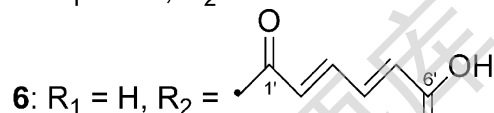
compound tested	EC ₅₀ (μg/mL)		
	L5178Y	PC 12	HeLa
6	5.3	>10	>10
7	0.6	7.2	5.9
10	1.9	>10	7.5
kahalalide F (positive control)	6.3	n.d. ^b	n.d. ^b



- 1: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$
 2: $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH$
 3: $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H$
 4: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$



- 5: $R_1 = OH, R_2 = H$



红树植物由于其特殊的海洋生境, 已经被广泛研究, 尤其是与红树植物共生、寄生或腐生等微生物已经成为天然产物研究的热点。2009年初, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室吴军研究员的研究组对半红树植物天然产物的资源、化学和生物活性进行了深入的研究^[8], 系统地总结和概述了1955年至2007年间从全球半红树植物中发现的天然产物的结构类型及其生物活性, 对今后该类群海洋植物天然产物的研究有着重要科学意义, 据悉, 全球有半红树植物14种, 它们主要分布在东南亚沿海, 这些特殊植物是结构新颖的小分子活性先导化合物发现的重要源泉。南海海洋所吴军研究员及其课题组自2001年以来对产自我国海南的老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*), 木果(*Xylocarpus granatum*)等数种红树植物的化学成分和生物活性进行了较系统的研究^[9, 10, 11]。

二、红树真菌及其次级代谢产物

1 红树植物及红树真菌简介

红树植物(mangroves)是自然分布于热带、亚热带潮间带或河口边缘, 受周期性潮水浸淹, 以红树植物为主体的常绿灌木或乔木组成的潮滩湿地木本植物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库